501—507

6837(22)

动 物 学 研 究 1996, 17（4）: 501—507 CN 53-1040／Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

小眼虫的着丝粒蛋白检查

吴传芬 代嘉陵[①] 李靖炎[①]* 王永潮
（北京师范大学生物系 100875）
（①中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室 650223）

Q959.112.5

A 摘要 为了从起源与进化的角度考察着丝粒蛋白，我们从比酵母更低等的原生生物着手，检查它们的着丝粒蛋白。另文我们已报道了对四膜虫研究的结果，本文报道的是对小眼虫（*Englena gracilis*）的检查。我们的结果表明：眼虫细胞核里存在的ACA抗原的分子量，包括了用ACA血清在高等生物中检出来的CENP-A、CENP-B、CENP-C和CENP-D这几类基本的着丝粒蛋白组分。作免疫荧光染色后，细胞核呈很强的阳性反应，但分辨不出前着丝粒小点。核仁不被荧光染色，除了核仁外似乎整个核都被染色。这可能反映了抗原的分布在核内不是集中成点状的。经过制备核骨架的程序处理后，细胞核仍为阳性（尽管荧光较弱）。如此看来，眼虫至少已有相当大一部分的ACA抗原是与核骨架结合着的。对分离的细胞核作相应的抽提处理后再作免疫印迹检查，得到的阳性反应带也证明了这一点。

关键词 小眼虫，着丝粒蛋白，ACA血清

前面的检查结果表明，纤毛虫已经具有了类似人的着丝粒抗原蛋白。要寻找着丝粒蛋白起源的线索，还必须考察更低等的真核生物。因此，我们进一步对眼虫进行了研究。

核糖体小亚基RNA(SSrRNA)的序列分析(Sogin等，1989；Cavalier-Smith，1989；Vossbrinck等，1987)和肽链延长因子EG-F／1 a的序列分析(Hasegawa等，1978)都表明眼虫类的进化地位比纤毛虫的低得多，甚至比粘菌还低等，而与寄生原生动物锥体虫类(trypanosomatids)的系统发生关系十分密切(Sogin等，1989；Vossbrinck等，1987)。对28S rRNA(核糖体大亚基rRNA)的分子进化研究的结果表明，锥体虫类比粘菌低等，但比原始真核生物——源真核生物的高等(Baroin等，1988；Lenaera等，1989；Cavalier-Smith，1978)，眼虫类显然也是如此。

眼虫（euglenoids）是其在原生动物学中的名称，在藻类学中眼虫又被算作裸藻。小眼虫（*Englena gracilis*）按原生动物学的分类系统隶属于原生动物门，鞭毛虫纲（Class Mastigophora），植鞭亚纲（Subclass Phytomastigina），眼虫目（Order Euglenoidina），眼虫科（Family Euglenidae），眼虫属，小眼虫种。按照藻类学的分类则属于裸藻门（Euglenophyta），裸藻纲（Euglenophyceae），裸藻目（Euglenales），裸藻科

吴传芬现在地址：美国Texas大学，M D Anderson Cancer Center，分子遗传学系，Houston，Texas 77030
* 通信作者

本文1995年8月4日收到，同年11月28日修回

(Euglenaceae)、裸藻属、纤细裸藻种。

1 材料与方法

1.1 材料及培养

小眼虫虫种和培养方法由陈阅增教授实验室惠赠。没用他们的方法在20—25℃下作光照悬浮培养。培养基：1000 ml中含蛋白胨0.5 g，胰蛋白胨0.1 g，牛肉膏0.1 g，酵母粉0.5 g，乙酸钠0.1 g，氯化钙0.001 g，pH6.8—7.0。

作为对照材料的人喉癌培养细胞*Hep*Ⅱ用1640培养基，加入谷氨酰胺至0.03%、胎牛血清至10%、青霉素和链霉素分别至100 u／ml。在37℃ CO_2培养箱内用培养瓶作单层贴壁培养。

1.2 方法

1.2.1 细胞核的分离 （1）*Hep*Ⅱ细胞的核分离：收集对数期生长的培养细胞，用PBS液洗涤3次、加入RSB液（0.01M Tris-HCl，0.01M NaCl，1.5mM $MgCl_2$，pH7.4），加入200mM PSF至终浓度为1mM，搅匀后冰浴放置。每5 min用次甲蓝（0.01%）染色检查1次，约40 min后细胞膨胀适度；离心弃RSB液。加入含0.5%NP—40，0.2%脱氧胆酸钠的RSB液，加入PMSF至1.2 mM，冰浴放置10 min；匀浆使细胞核释放出来。加入含0.05%Triton X-100的buffer A至原体积之10倍，加入PMSF至1.2 mM，搅匀后冰浴放置10 min；离心弃上清液。用含0.5% Triton X-100和1.2 mM PSF的RSB液处理细胞核沉淀，加入buffer A搅匀。离心弃上清液，次甲蓝染色检查沉淀中核的纯度。通常经1次洗涤则可得到比较纯的细胞核，否则再洗涤处理1次即可。

（2）小眼虫细胞核的分离：离心收集对数生长期的眼虫，用适量体积的含25% Ficoll 400（聚蔗糖400）的buffer A悬浮细胞，超声处理使细胞核释放。分离和纯化细胞核的步骤与*Hep*Ⅱ的相同，但需要酌情调整g值。

1.2.2 制备核骨架的细胞分极抽提 小眼虫细胞的分级抽提：收集对数生长期的小眼虫，用Cook（0）液洗涤两次；用Cook（2）液作悬浮冰浴处理30 min，中途换液1次。用CSK液洗涤除去磷酸根。用DNaseI消化液（含DNase 200 μg／ml）处理，用DAPI染色检查消化的进程，每30 min换液1次。消化完毕弃DNase液，用Cook（0）-0.25M硫酸铵4℃处理10 min，Cook（0）洗1次，Cook（0）-2M NaCl 4℃处理10 min，Cook（0）洗涤制片做荧光染色。

1.2.3 制备核骨架的细胞核分级抽提 *Hep*Ⅱ细胞核的抽提：在细胞核沉淀中加入CSK液，冰浴搅匀处理5 min，离心弃CSK液，加入DNaseI消化液（含DNaseI 100—400 μg／ml），搅匀室温放置。每5 min用DAPI染色检查1次，约40—60 min，DNA已除去。加入硫酸铵（使终浓度为0.25M），搅匀处理5 min，离心弃消化液。加入EXTR液处理5 min，离心弃EXTR液。用PBS液洗涤3次，弃上清液。

眼虫细胞核的分级抽提与细胞的分级抽提的方法和步骤相同。

1.2.4 间接免疫荧光染色与四膜虫一文（吴传芬等，1996b）相同。

1.2.5 免疫印迹用我们改进后的方法（吴传芬等，1996a）。

1.2.6 抗体与吴传芬等（1996）一文相同。

1.2.7 溶液见免疫印迹技术的改进一文（吴传芬等，1996a）。

2　结果与讨论

E. gracilis 是眼虫类中研究得最深入的一个种。其细胞为长园柱形至狭卵形，长约 35—66 μm，宽 8—18 μm；能变形。前端略窄，有 1 条鞭毛，长度约为身长的 0.5—1 倍；后端作钝圆或短钝尾状。细胞核近平园形，位于细胞中部；核内有 1 个比较大的核仁。

2.1　免疫荧光染色

用 ACA 血清对未经抽提处理的细胞作免疫荧光染色后，细胞核呈很强的阳性反应，但分辨不出前着丝粒小点。核仁不被荧光染色，除了核仁外似乎整个核都被染色（图 1）。这可能反映了抗原的分布在染色体上不是集中成点状的。细胞质中有一些颗粒物也被染色。实际上在过去很长时间内一直认为眼虫染色体还没有分化出着丝粒和动粒，因为没有观察到与之有关的结构。关于小眼虫染色体有动粒结构的报道是 Gillott 和 Triemer（1978）在电镜下观察其核分裂时才见到的。这是一个极小的结构，似乎只有 1 根微管与一小块并不太致密的染色质团与之结合。结合处虽然很小，但已有 3 层结构。这在光镜下自然是无法分辨的。如此，眼虫的着丝粒和动粒就不是集中地分布在染色体上的一个特定的区域。这与我们的观察结果是相符的。



图1　小眼虫间期细胞的ACA血清免疫荧光染色结果

Fig.1　The immuno-fluorescent staining of the interphase nucleus of *E. gracilis* by ACA anti-serum

箭头示被荧光标记的细胞核，分辨不出点状的前着丝粒，核仁不被染色。细胞质中也有荧光(Arrow shows the fluorescence stained cell nucleus. No spot-like precentromere is observed. Cytoplasm is also stained)



图2　经过制备核骨架的细胞分级抽提技术处理的小眼虫间期细胞的 ACA 血清免疫荧光染色结果

Fig.2　The immuno-fluorescent staining of the uncleus of *E. gracilis*, tueated by sequential specific extractions, by ACA anti-serum

箭头示被荧光标记的细胞核。细胞质中的阳性反应颗粒荧光更强(Arrow shows the fluorescent-labeled nucleus. The positive-reacting particles in cytoplasm give more strong fluorescence).

在经过抽提的细胞中其细胞核和胞质里的一些颗粒的荧光反而增强（图 2）。这可能是由于细胞核与和胞质中的抗原不会被盐抽提，而在可溶性蛋白被出去以后，荧光的反差更好，看起来更明显的缘故。细胞质中的阳性反应颗粒的性质还不清楚，有可能是叶绿体或线粒体中的成分。

经过 DNase 消化，硫酸铵处理和高浓度（2M）NaCl 处理后，细胞核和胞质中的颗粒仍为阳性，尽管荧光较弱（图 2）。已经有不少的研究报道表明高等生物的 ACA 抗原是与核骨架或染色体骨架相结合的（Cox 等，1983，1985；Earnshaw 等，1984；Yen

等，1991；Maul等，1986；张焕相，1993）。如此看来，眼虫至少已有相当大一部分的ACA抗原是与核骨架相结合。对分离的细胞核作相应的抽提处理后再作免疫印迹检查，得到的阳性反应带也证明了这一点（图3）。

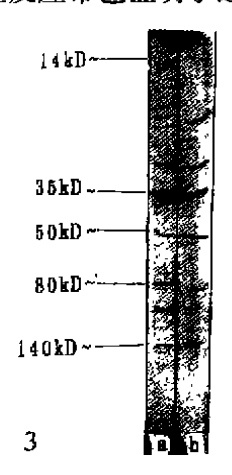


图3 ACA血清免疫印迹结果

Fig.3 The result of the immuno-blotting detection by ACA anti-serum

a. 细胞核全蛋白(The nucleus proteins)；

b 细胞核经过分级抽提后的蛋白样品(The nuclear proteins in the nucleus by sequntial specific extractions)。

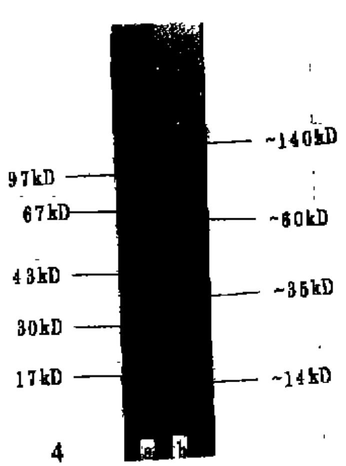


图4 小眼虫细胞全蛋白的ACA血清免疫印迹的结果

Fig.4 The result of the immuno-blotting detection of the total proteins of *E. gracilis*, by ACA anti-serum

a. 标准分子量蛋白(standard proteins for identifying molecular weights)；

b. 小眼虫样品(*E. gracilis*)。

E. gracilis 在有一些方面表现出典型真核生物的特征，例如染色质中含有5种组蛋白（Moyne等，1975）具有作念珠状的核小体（Haapaala, 1975）；细胞周期已有G1、S、G2和M期的分化等（Ledoigt等，1979）。但在另一些方面又没达到典型真核生物的水平，例如染色体在整个细胞周期中始终处于凝聚状态（Raikov, 1980；Moyne等，1975；Leedale, 1970；Gillott等，1978），有一些染色质纤维从凝聚的染色体伸到核质里（Moyne等，1975；Magnval等，1979）。分散的染色质大约占其总量的14%（Lynch等，1975）；染色体的端粒与核膜结合（Moyne等，1975；Kluyeva等，1978）；核分裂为封闭式的核内有丝分裂；核膜、核仁在核分裂过程中不消失；中期染色体不会整齐地排列在赤道板上等（Raikov, 1980）。过去认为眼虫类的染色体是不与纺缍体结合的，直到1978年Gillott和Triemer才在电镜下观察到 *E. gracilis* 分裂的细胞核中染色体与纺缍体微管的联系。

2.2 免疫印迹

2.2.1 ACA血清的印迹结果 全细胞蛋白对ACA血清的反应带比较多，分子量分别约为14 kD、30 kD、35 kD、50 kD、60 kD、80 kD、120 kD、140 kD等（图4）。其中35 kD的带反应最强，而且是由两条带组成的。这可能是眼虫的特点，因为在*Hep*II和四膜虫中35 kD处都只看到1条带。

由于细胞质中有阳性反应颗粒存在，因此必须用分离出的细胞核来作印迹。结果得到这样一些反应带：约14 kD、30 kD、35 kD、50 kD、80 kD、140 kD等。此外在14—

30 kD 之间还有两条带（图 3）。其中 14 kD 的带未显示出来，但并不是没有。因为在抽提过的核样品中是有这条带的（图 3b）。从眼虫细胞核里存在的 ACA 抗原的分子量看，包括了用 ACA 血清在高等生物中检出来的 CENP-A、CENP-B、CENP-C 和 CENP-D 这几类基本的着丝粒蛋白组分。

2.2.2　ra-ACA-2 的印迹结果　用 ra-ACA-2 检查，得到 3 条带，分子量分别约为 50 kD、60 kD 和 80 kD（图 5）。反应与四膜虫和 *Hep*Ⅱ的一致。这表明 CENP-B 在进化上是很保守的。

2.2.3　mACA-2 的印迹结果　与四膜虫的相似，*E. gracilis* 也有 3 条对 mACA-2 检查的阳性反应带，1 条分子量约 80 kD，另外两条带分子量都比较高，与嗜热四膜虫的相似（图 6）。

2.2.4　mAb37A5 的印迹结果　经免疫印迹检查后，*E. gracilis* 对 mAb37A5 的反应带有两条，其中一条与四膜虫的相似，是高分子量蛋白；另一条是四膜虫所没有的，分子量约为 45 kD（图 7）。45 kD 蛋白的存在可能意味着这种动粒蛋白的保守性不如 CENP-B 的强。不过这需要作进一步的检查。

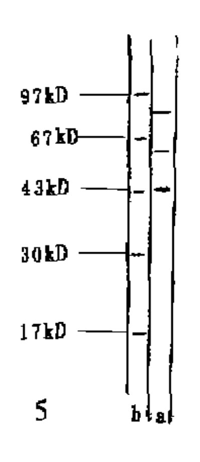


图 5　CENP-B 多抗 ra-ACA-2 的印迹结果

Fig.5　The result of the immuno-blotting detection by polyclonal antibody, ra-ACA-2, against human CENP B

a　小眼虫样品(*E. gracilis*)

b. 标准分子量蛋白(standard proteins for identifying molecular weights).

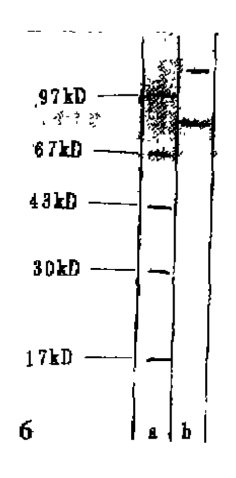


图 6　CENP-B 单抗 mACA-2 的印迹结果

Fig.6　The result of the immuno-blotting detection by monoclonal antibody, m-ACA-2, against human CENP B

a　标准分子量蛋白(standard proteins for identifying molecular weights);

b. 小眼虫样品(*E. gracilis*)。

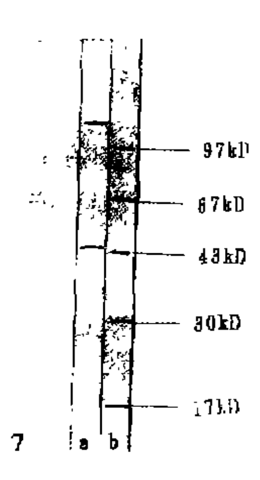


图7　mAb37A5单抗的印迹结果

Fig.7　Immuno-blotting detection by monaclonal antibody, mAb37A5, angaist the kineto chore

a. 小眼虫样品(*E. gracilis*)

b. 标准分子量蛋白(standard proteins for identifying molecular weights)。

参 考 文 献

吴传芬，李靖炎，代嘉陵，1996. 涡鞭毛虫（甲藻）着丝粒／动粒蛋白的检查. 动物学研究，17(3)：307—313.

Baroin A, Perasso R, Qu L -H, BruGerolle G *et al*, 1988. Partial phylogeny of unicellular eukaryotes based on rapid sequencing of a portion of 28S rRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 3474-3478.

Cavalier-Smith T, 1989. Archaebacteria and archezoa. *Nature*, **339**. 100-101

Cavalier-Smith T, 1987. Eukaryotes with no mitochondria. *Nature*, **326** 332-333.

Cox, J V, Olmsted J B, 1985 Molecular Biology of the Cytoskeleton. Cold Spring Harbor laboratory Press. 71-77.

Cox J V, Schenk E A, Olmsted J B, 1983. Human anticentromere antibodies: distribution, characterization of antigens, and efficient on microtubule organization. *Cell*, **35**: 331-339.

Earnshaw W C, Halligan N, Cooke C A *et al*, 1984 The kinetochore is part of the metaphase chromosome scaffold. *J Cell Biol.*, **98** 352-357

Gillott M A, Triemer R E, 1978. The ultrastructure of cell division in *Euglena gracilis* *J. Cell, Sci.*, **31**: 25-35.

Haapaala O K, Soyer M O, 1975 Organization of chromosome fibrils in *Euglena gracilis*. *Hereditas*, **80**: 185-194.

Hasegawa M, Hashimoto T, Adachi J *et al*, 1993 Early branchings in the evolution of eukaryotes: ancient divergence of Entamoeba that lacks mitochondria revealed by protein sequence data. *J. Mol. Evol.* **36**: 380-388.

Kluyeva T S, Chentsov Yu, Polyakov V Yu, 1978. Electron microscope study of the nucleus of *Euglena gracilis.Tsitologia*, **20**: 987-991.

Lenaers G, Maroteaux L, Michot B *et al*, 1989. Dinoflagellates in evolution. A molecular phylogenetic analysis of large subunit ribosomal RNA. *J. Mol. Evol.*, **29**: 40-51.

Lynch M J, O'connell, Buetow D E, 1975. Isolation, fractionation and template activity of the continuously-condensed chromatin of *Euglena gracilis.Exper. Cell Res.*, **91**: 349-357.

Magnval R, Bertanx O, Valencia R, 1979 Hetero- and euchromatin of synchronous Euglena cells. *Exper. Cell Res.*, **121** 251-265.

Maul G G, French B T, Van Venrooij W J *et al*. 1986. Topoisomerase Ⅰ identified by scleroderma 70 antisera *Proc Natl. Acad. Sci USA* **83**. 5145-5149.

Moyne G, Bertaux. G, Puvion E, 1975. The nucleus of *Euglena*. *J. Ultra. Res.* **52** 362-375,

Raikov I B, 1980. In: The Protozoan Nucleus Morphology and Evolution (Translated from the Russian by Bobrov, N and Verhovtseva, M, Springer-Verlag / Wien press)

Sogin M L, Gunderson J H, Elwood H J *et al*, 1989 Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an universal rRNA from *Giardia lamblis Science*, **243**: 75-77.

Vossbrinck C R, Maddox J V, Friedman S *et al*, 1987. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature*, **326**: 411-414.

THE DETECTION OF CENTROMERE PROTEINS IN *Euglena gracilis*

Wu Chuanfen[①] Dai Jialing[②] Li Jingyan[②] Wang Yongchao[①]

(①:*Dept. of Biology, Beijng Normal University, Beijng* 100875)

(②:*Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Scinces, Kunming* 650223)

Abstract

In this paper we report our detection of centromere proteins in *Euglena gracilis*. With Immunofluorescent microscopy stained with Chinese ACA antiserum, in the interphase nucleus of *Hep*Ⅱ cells (human throat cancer cells) only very minute pots—precentromere could be observed. When *Euglena* was stained with the same technique, there were only patched within nuclei composed of minute fluorescent spots; no precentromere could be distinguished, al-

though all the nuclei gave positive reaction. Perhaps the distribution of centromere / kinetochore proteins within the interphase nucleus of protists was different from that of higher organisms. After sequential selective extractions to prepare nuclerar matrix, the nuclei of *Euglena* still gave reactions to prepare nuclear matrix, the nuclei of *Euglena* still gave reaction to ACA serum under immunofluorescent microscope. This fact indicates that the centromere / kinetochore proteins of protists are also tightly combined with nuclear matrix, just as those of higher organisms do. This tight combination with nuclaer matrix was further proved with immnoblotting. The positive band-pattern of *Euglena* cells was still similar to that of *Hep*II after immunoblotting with Chinese ACA serum, although the band number was slightly fewer. The molecular weights of positive bands indicate that euglenoid has likely possessed the main components of centromere proteins; CENP-A, CENP-B, CENP-C and CENP-D etc. The blotting results with mACA-2 antibody showed that *Hep*II cells gave two bands (80 kD, stained deely and 120 kD, stained slightly) *Euglena* gave three bands 80 kD, 120 kD, and 150 kD.

The blotting results with ra-ACA-2 antiserum were some what different, although it also recognized human CENP-B protein. All *Hep*II and *Euglena* gave 50 kD, 60 kD and 80 kD band.

In the immunoblotting with monoclonal antibody mAb37A5, *Hep*II cells gave two bands very similar to those of CHO cells. *Euglena* showed two bands, one identical to the tetrahymena band, another being about 55 kD.

Key words *Euglena gracilis*, Centromere proteins, ACA serum